

一种可用以抗癌治疗的超抗原融合蛋白质及其生产方法

技术领域

本发明涉及分子生物学领域，特别是一种融合蛋白。还公开了含有该融合蛋白的表达载体和宿主细胞，及其制备方法。

背景技术

目前对于癌症疾病的药物治疗主要是以化学药物为主，副作用大，化学药物在杀伤癌细胞的同时也伤害了正常细胞，化学药物缺乏针对癌细胞的特异性作用。

为了解决药物的特异性问题，抗体是一类很有效的工具，是一种常用的癌细胞特异性定位导向载体，它可以特异地作用于癌细胞。抗体本身可以封闭癌细胞，它的 Fc 片段能引起细胞毒作用。抗体也可以接上一个毒素蛋白质，引导毒素蛋白质杀死癌细胞。

超抗原 (Superantigen) 也能引起细胞毒作用，它是一类特殊的抗原分子，主要是一些细菌的毒素和逆转录病毒基因的产物，不需要抗原提呈细胞的加工处理，而以完整的蛋白质形式直接与细胞膜上的 MHC II 类分子结合形成复合物，识别 TCR 的 V β 片段，激活比普通抗原多得多的 T 细胞 (包括 CD4⁺, CD8⁺)，并释放大量细胞因子，对靶细胞产生强而有力的细胞毒作用。

超抗原与人类多种急、慢性疾病的发生有关，但在抗肿瘤研究中也发挥了独特的作用，尝试用它激活的 T 细胞来杀伤肿瘤，并取得了一定的成果，目前较有研究基础的超抗原主要是金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B 等。因为超抗原无抗肿瘤的 specificity，它也会作用于表达 MHC II 类分子的正常细胞上，直接用于抗肿瘤会产生副作用，临床使用有很多的限制。

为了解决超抗原的无抗肿瘤特异性问题，人们将超抗原连接到抗体上，由抗癌抗体将超抗原金黄色葡萄球菌肠毒素 A (Staphylococcal-enterotoxin A, SEA) 定位到癌细胞上 (M. Dohlsten, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 8945-8949, 1994; J. Ihle, et al, Cancer Res., 55, 623-628, 1995)。该 SEA 基因早在 80 年代就报道了 (I. Y. Huang, et al, J. Biol. Chem., 262, 7006-7013, 1987; M. J. Betley and J. J. Mekalanos, J. Bacteriol., 170, 34-41, 1988)。

要使抗体成为药物，就必须对于鼠源抗体进行人源化的基因工程改造。由于抗体药物的使用剂量很大，常常需要数十毫克/人/次，这就要求提高基因工程抗体的动物细胞的表达水平以及发展大规模发酵技术。所以抗体药物的研究开发的

周期和投资成本是非常巨大的。

除了抗体外，与癌细胞生长有关的细胞因子也被用于癌细胞的特异性定位。例如表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)被连接到RNA水解酶(H. Jinno, et al, Cancer Chemother. Pharmacol., 38, 303-308, 1996)和毒素(A. Schmidt, et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 277, 499-506, 2000)，碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial cell growth factor, VEGF)和转化生长因子(Transforming growth factor- α , TGF- α)也分别与毒素形成融合蛋白质(Biochem. Biophys. Res. Commun., 277, 499-506, 2000; L. M. Veenendaal, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 7866-7871, 2002; A. Kihara and I. Pastan, Cancer Res., 54, 5154-5159, 1994)。而其它的细胞因子也有报告，例如白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)和白细胞介素-2(Interleukin-2, IL-2)则分别被连接到毒素上(S. R. Husain, et al, Cancer Res., 58, 3649-3653, 1998; J. M. Dore, et al, FEBS Lett., 402, 50-52, 1997)。

EGF基因在80年代早期被发现了(J. Smith, et al, Nucleic Acids Res., 10, 4467-4482, 1982; A. Gray, et al, Nature, 303, 722-725, 1983)，它的成熟形式是53氨基酸的多肽。

VEGF基因是在80年代后期被发现(D. W. Leung, et al, Science, 246, 1306-1309, 1989; P. J. Keck, et al, Science, 246, 1309-1312, 1989)，由于mRNA的不同剪切，它的成熟形式有多种形式，长度可以是189、165以及121氨基酸的多肽(E. Tischer, et al, J. Biol. Chem., 266, 11947-11954, 1991)。

以上工作都使用细胞因子与蛋白质毒素或RNA水解酶所组成的融合蛋白质的形式，思想方法是出于同样的战略模式(E. B. Sweeney and J. R. Murphy, Essays Biochem., 30, 119-131, 1995)。在这些细胞因子的癌细胞定位的作用下，蛋白质毒素和RNA水解酶才特异地杀伤癌细胞。但是这个作用机制不同于抗体的Fc片段以及超抗原，后两者是动员机体的免疫系统来激发抗癌的细胞毒作用。

癌细胞是由正常细胞转变而来的，癌细胞的抗原是自身抗原，所以癌细胞能够逃避免疫系统的监视。人们一直在寻找新的抗癌方法来提高癌症病人的免疫力，特别是针对癌细胞的特异性免疫力。因此，本领域迫切需要一种特别针对癌细胞的强有力的新的抗癌方法。

发明内容

因此，本发明的一个目的是提供一种对癌症具有特异性的，杀伤力强的方法。在本发明的一个方面，提供了一种融合蛋白，其含有：

- a)促进癌细胞生长并与癌细胞过度表达受体相对应的配体、与癌细胞受体有亲和力及有拮抗作用的人工筛选多肽或直接与癌细胞表面相互作用的多肽分子；
b)能引起抗癌的免疫反应的超抗原。

在该方面的一个优选例中，该配体选自：表皮生长因子 EGF 家族、血管内皮细胞生长因子 VEGF 家族、碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 及 FGF 家族、转化生长因子 TGF- α 、白细胞介素-4、白细胞介素-2、白细胞介素-6、白细胞介素-13、肝素结合 EGF 样生长因子、胰岛素样生长因子、肝细胞生长因子、血小板衍生生长因子、神经生长因子、胎盘生长因子、干细胞因子、白细胞介素-8、Ephrin 家族、Heregulin、erbB 配体、趋化因子、血管生成素、血小板生成素、凝血因子 VII、尿激酶型纤溶酶原激活物、生长激素释放激素、生长抑素、去唾液酸糖蛋白、低密度脂蛋白和转铁蛋白以及其它与癌症或免疫疾病有关联的配体，及其氨基酸序列有 70%以上的相同性的自然变异体和人为的变异体。更优选的，选自表皮生长因子和血管内皮细胞生长因子。

在该方面的另一个优选例中，该超抗原选自：金黄色葡萄球菌肠毒素家族的 SEA、SEB、SEC、SED、SEE，链球菌毒素的 SPE-A、SPE-B、SPE-C，病毒蛋白以及其氨基酸序列有 70%以上的相同性的自然和人为的变异体。更优选的，选自金黄色葡萄球菌肠毒素家族的 SEA。

在该方面的还有一个优选例中，超抗原是 SEA 蛋白；配体选自表皮生长因子和血管内皮细胞生长因子。

在该方面的一个优选例中，融合蛋白含有(a)超抗原；(b)配体；(c) 可操纵性连接超抗原和配体的接头。更优选的，超抗原是 SEA 蛋白；配体选自 EGF 或 VEGF；所述接头具有 SEQ ID NO:5 的核苷酸序列。更优选的，该接头编码 SEQ ID NO: ID NO:6 的氨基酸序列。

在该方面的一个优选例中，融合蛋白具有 SEQ ID NO: 1 或 3 的核苷酸序列编码的氨基酸序列。优选融合蛋白具有 SEQ ID NO: 2 或 4 的氨基酸序列。

在本发明的另一个方面，提供了一种重组载体，含有编码上述融合蛋白的核苷酸序列。

本发明的还有一个方面提供了一种宿主细胞，含有上述重组载体。

在本发明的另一个方面，提供了一种生产上述融合蛋白的方法，包括步骤：培养上述宿主细胞，收集表达的上述融合蛋白。

在该方面的一个优选例中，还包括纯化收集的融合蛋白的步骤。

在本发明的还有一个方面，提供了上述融合蛋白用于制备治疗癌症或免疫疾病的药物的用途。

附图说明

图 1 是表示用 PCR 方法构建 EGF-SEA 融合蛋白质基因的构建图。首先经过第一次 PCR 反应分别取得 EGF 和 SEA 基因的 DNA 多核苷酸片段，然后利用重叠延伸 PCR 方法将这两个片段连接在一起，这样就将形成的 EGF-SEA 融合蛋白质的基因片段插入一个大肠杆菌表达用的载体并进行融合蛋白质的生产。

图 2 是表示用 PCR 方法构建 VEGF-SEA 融合蛋白质基因的构建图。其中的实验过程是首先经过第一次 PCR 反应分别取得 VEGF 和 SEA 基因的 DNA 多核苷酸片段，然后利用重叠延伸 PCR 方法将这两个片段连接在一起，这样就将形成的 VEGF-SEA 融合蛋白质的基因片段插入一个大肠杆菌表达用的载体并进行融合蛋白质的生产。

图 3 表示了 EGF-SEA 融合蛋白质纯化后的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果。

图 4 表示了 VEGF-SEA 融合蛋白质纯化后的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果。

图 5 表示了 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白抑制肿瘤细胞的实验结果。

具体实施方式

为了有效地开发针对癌症的特异性药物，本发明利用超抗原和细胞因子的各自特性，构建一种新型细胞因子-超抗原融合蛋白质，促进癌细胞生长的细胞因子可以将融合蛋白质定位到癌细胞上，而超抗原则在癌细胞周围引起抗癌的免疫反应，即超抗原依赖的细胞介导的细胞毒作用（Superantigen-dependent-cellular-cytotoxicity, SDCC）。利用此方法就可以将这种类型的融合蛋白质特异地定位到癌细胞并在癌细胞周围引起抗癌的细胞毒免疫反应。

本发明选择了一个崭新的战略，将超抗原连接到细胞因子上，这样产生了新型的细胞因子-超抗原融合蛋白质，作为一个模型，本发明使用表皮生长因子 EGF 和血管内皮细胞生长因子 VEGF 分别与超抗原 SEA 来构建这种新型的融合蛋白质。

在此虽然只选择超抗原 SEA，当然超抗原 SEB 和 SEC 以及其它超抗原也能够说明本发明的思想。抗原 SEA 或其它超抗原的作用是激发机体内的免疫反应。

同样，作为实验材料的表皮生长因子 EGF 和血管内皮细胞生长因子 VEGF 只是利用它们癌细胞的定位作用，采用与癌细胞紧密相关的其它细胞因子也能够说明本发明的思想。

考虑到本发明的融合蛋白质可以由各种类型的细胞因子与超抗原构建，所以采用了一个通用的蛋白质纯化方法，即按照同样的方法来纯化各种融合蛋白质。此方法是利用一个 Cellulose binding domain (CBD) 作为纯化用的 Tag，质粒 pET-34b (Novagen 公司) 含有这个 CBD-Tag。

采用与癌紧密有关的细胞因子作为癌细胞定向的载体，是因为癌细胞通常大量表达这些细胞因子的受体。以 EGF 为例，癌细胞膜上通常异常地大量表达 EGF 受体，EGF 通过与 EGF 受体相互作用来促进癌细胞的生长。同样癌组织也通过异常高表达 VEGF 受体来接受 VEGF 的信号，促进癌组织血管异常生长，从而使得整个癌组织不断扩大。

而正常细胞膜上的这些受体的表达量没有或很少，所以细胞因子也可以起着癌细胞的特异性定位作用。利用 EGF 和 VEGF 能认识癌细胞的特性，把超抗原 SEA 分别连接到 EGF 和 VEGF 上，就能使得 SEA 集中在癌细胞的周围，特异地激发免疫反应，产生极其强大的针对癌细胞的细胞毒作用。单独使用超抗原 SEA 会产生全身用药的副作用，而采用融合蛋白质就会使得只在癌组织周围集中由 SEA 所诱导的大量 T 杀伤细胞。

超抗原 SEA 与 T 细胞激活产生增殖和产生细胞毒作用呈剂量依赖关系，其范围在每只小鼠 $0.1 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$ ，最大效应出现在注射后 24 小时，96 小时内消失，SDCC 最大效应浓度为每只小鼠 $1 \mu\text{g}$ ，效应高峰在第 48 小时，96 小时内消失 (G. Hedlund, et al, Cancer Immunol. Immunother., 36, 89-93, 1993)。

所以融合蛋白质可以发挥类似于抗体-SEA 的作用，而采用这个方法能够节约药物开发成本，例如小鼠抗体人源化和大规模动物细胞表达生产。所以超抗原 SEA 的药物就能大大地降低药物生产和病人医疗成本，同样含有超抗原 SEA 的本发明的融合蛋白质也可以大大地降低使用剂量。

EGF-SEA 和 VEGF-SEA 仅仅是用来说明本发明的材料，而本发明的思想范围可以拓展，例如可以采用各种类型的细胞因子和超抗原以及它们的变异体，对融合蛋白质的结构进行改造，这些变异体可以完善其生物学功能以及减少其可能产生的副作用。

融合蛋白质可以是 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 形式，也可以是 SEA-EGF 和 SEA-VEGF 形式，在空间上两种蛋白质是独立的，所以两种形式都可以使得细胞因子和超抗原独立地发挥作用。

连接这两种蛋白质的接头的氨基酸组分和长度则可以是各种形式，过短的接头会造成细胞因子和超抗原因过分接近而产生空间阻碍，合适的接头对于充分发挥细胞因子和超抗原的作用是至关重要的。

以上的各种融合蛋白质基因可以转入动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母、细菌等生物体在内的重组工程化宿主细胞，表达方式可以是分泌和不分泌等各种形式。无细胞体外翻译系统也可以用来进行融合蛋白质的生产。

融合蛋白质也可以通过化学交联反应等化学反应手段分别将细胞因子和超抗原的多肽片段进行连接，例如共价键连接，从而构建成融合蛋白质。

对于融合蛋白质可以进行化学修饰、缺损融合蛋白质的一部分多肽片段以及将其它多肽连接在这些蛋白质上等一系列的改造。

纯化后的融合蛋白质可以通过一系列蛋白质的变性和复性过程来完善其包括二硫键在内的空间结构，从而提高它的生物活性。

本发明阐述的是一种新的抗癌方法，即把细胞因子和超抗原构建成融合蛋白质，由细胞因子将超抗原定位到癌细胞上，从而在癌细胞周围发生抗癌的细胞毒免疫反应。

从更大的范围来看，细胞因子与其癌细胞表面上过度表达的受体实际上是一种配体 (Ligand) 和受体之间相互作用的关系，利用这种配体和受体的亲和力，将超抗原定位到肿瘤组织。除了细胞因子外，其它有与癌细胞过度表达受体相对应的多肽分子即配体也可用于癌细胞的特异性定位。这样的物质有各种趋化因子 (Chemokine)、Ephrin 家族、血管生成素 (Angiopoietin, Ang)、血小板生成素 (Thrombopoietin, TPO) 和血浆第 VII 因子 (Factor VII)、尿激酶型纤溶酶原激活物 (Urokinase-type plasminogen activator, uPA)、生长激素释放激素 (Growth hormone releasing hormone, GHRH)、生长抑素 (Somatostatin, SST)、去唾液酸糖蛋白 (Asialoglycoprotein, ASGP)、低密度脂蛋白 (Low density lipoprotein, LDL) 和转铁蛋白 (Transferrin, Tf) 等，许多肿瘤组织都过量表达这些物质的受体，从而趋化因子、酶、激素及其它蛋白等多肽分子配体就可以像细胞因子那样与超抗原相连接形成融合蛋白质，将超抗原定位到肿瘤组织。

除了上面所说的与癌细胞上的受体对应的配体外，从噬菌体展示 (phage display) 等方法筛选到的与癌细胞上的受体有亲和力并有拮抗作用的人工筛选多肽以及其它能够直接与癌细胞表面相互作用的多肽分子都可以和超抗原形成融合蛋白质。

融合蛋白质不但可以起着和抗体相似的特异性抗癌作用，而且由超抗原所激发的 T 细胞杀伤效果要大于抗体，使用剂量却远远低于抗体药物的用量，这样就可以大大地降低生产成本。

作为药物形式应用的以上各种类型的融合蛋白质可应用于抗癌和免疫疾病等医学的临床方面，它们和防腐剂、乳化剂、脂质体、分散剂、安定化剂等一起制成各种注射、口服、敷贴以及手术处理等药物的给药形式。

除了融合蛋白质本身可以作为药物外，编码融合蛋白质的核苷酸片段或载体还可以作为基因治疗形式来应用。例如将这些核苷酸片段注射动物体内并被转入细胞，从而表达融合蛋白质。

根据已知的 SEA、EGF 和 VEGF 基因序列，设计一系列的引物，通过多聚酶链

反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 分离这些基因, 再用 PCR 方法将 EGF 和 VEGF 分别与接头和 SEA 连接形成一个融合蛋白质的 DNA 片段。然后将这个基因片段插入一个大肠杆菌表达质粒, 在 T7 启动子的控制下, 融合蛋白质大量表达, 最后将表达的融合蛋白质进行分离纯化。

本发明实验中所使用的编码蛋白质和多肽的形式:

(1) 成熟形式的 SEA; (2) 53 氨基酸的 EGF; (3) 121 氨基酸的 VEGF; (4) 用于连接细胞因子和超抗原的接头, 它的多核苷酸组成是 GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG (SEQ ID NO: 5), 编码了 15 氨基酸的 GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer (SEQ ID NO: ID NO: 6) 的多肽。

使用的大肠杆菌质粒是 pET-34b (Novagen 公司), 长度约为 6kb, 它含有起始密码子 ATG 以及终止信号 TAA, 在这两者之间有多个限制酶位点以及用于分离纯化的 CBD-Tag, 在此采用的是 SrfI 和 NotI 限制酶位点, 另外作为选择用的抗生素是卡那霉素, T7 启动子控制基因表达。

以下实施例是为了更清楚的说明本发明, 而不是为了特别限制。

实施例 1、分离超抗原 SEA 基因

按照常规的分子生物学实验方法 (T. Maniatis, et al, Molecular cloning, A laboratory manual, Second edition, Cold spring harbor laboratory, 1989), 用酚/氯仿抽提法从金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus FRI337) 的 DNA, 根据文献上的超抗原 SEA 基因的序列 (M. J. Betley and J. J. Mekalanos, J. Bacteriol., 170, 34-41, 1988) 设计引物: (1) 含有 SrfI 限制酶切点的正向引物, 5'-GAGCCCGGGCAGCGAGAAAAGCGAAGAAATAAAT-3' (SEQ ID NO: 7); (2) 含有 NotI 限制酶切点的反向引物, 5'-GTGCGGCCGCACTTGTATATAAATATATATCAATATGCAT-3' (SEQ ID NO: 8)。用此引物将 SEA 基因进行 PCR 扩增反应。模板的量为 0.1 微升, PCR 反应的循环条件: 95°C 30 秒 → 55°C 30 秒 → 72°C 120 秒, 一共是 30 个循环反应, 最后是 72°C 10 分钟。DNA 片段的长度大约是 700bp。

将这个 DNA 产物进行低熔点胶的电泳, 回收 DNA 片段, 再对这个片段进行 SrfI 和 NotI 限制酶处理后, 得到的基因片段插入 pET-34b 质粒, DNA 连接酶的反应是 16°C 12 小时。最后进行 DNA 测序。

实施例 2、分离表皮生长因子 EGF 基因

根据已报告的表皮生长因子 EGF 基因序列设计引物 (J. Smith, et al,

Nucleic Acids Res., 10, 4467-4482, 1982): (1) 含有 SrfI 限制酶切点的正向引物, 5'-GAGCCCGGGCAATTCCGATAGCGAGTGT-3' (SEQ ID NO:9); (2) 含有 NotI 限制酶切点的反向引物, 5'-GTGCGGCCGCTCTAAGTTCCCACCATT-3' (SEQ ID NO: 10)。利用 PCR 方法从人乳癌 cDNA 基因文库 (Clontech 公司) 中分离 EGF 基因, 它编码一个 53 氨基酸的多肽。模板的量为 0.1 微升, PCR 反应的循环条件: 95°C 30 秒→55°C 30 秒→72°C 30 秒, 一共是 30 个循环反应, 最后是 72°C 10 分钟。DNA 片段的长度大约是 170bp。

将这个 DNA 产物进行低融点胶的电泳, 回收 DNA 片段, 再对这个片段进行 SrfI 和 NotI 限制酶处理后, 然后将基因片段插入 pET-34b 质粒, DNA 连接酶的反应是 16°C 12 小时。最后进行 DNA 测序。

实施例 3、分离血管内皮细胞生长因子 VEGF

从报告的血管内皮细胞生长因子 VEGF 基因序列 (P. J. Keck, et al, Science, 246, 1309-1312, 1989; E. Tischer, et al, J. Biol. Chem., 266, 11947-11954, 1991) 中设计 VEGF-121 的引物: (1) 含有 SrfI 限制酶切点的正向引物, 5'-GAGCCCGGGCGCACCCATGGCAGAAGGAGGA-3' (SEQ ID NO:11); (2) 含有 NotI 限制酶切点的反向引物, 5'-GTGCGGCCGCGCCTCGGCTTGTCACATTTTCTTGCTCTATCTTTCTT-3' (SEQ ID NO: 12)。利用 PCR 方法从人乳癌 cDNA 基因文库 (Clontech 公司) 中分离 VEGF-121 基因, 它编码一个 121 氨基酸的多肽。模板的量为 0.1 微升, PCR 反应的循环条件: 95°C 30 秒→55°C 30 秒→72°C 50 秒, 一共是 30 个循环反应, 最后是 72°C 10 分钟。DNA 片段的长度大约是 370bp。

将这个 DNA 产物进行低融点胶的电泳, 回收 DNA 片段, 再对这个片段进行 SrfI 和 NotI 限制酶处理后, 然后将基因片段插入 pET-34b 质粒, DNA 连接酶的反应是 16°C 12 小时。最后进行 DNA 测序。

实施例 4、用含有接头的引物构建 EGF 和 SEA 的融合蛋白质的基因

通过重叠延伸 PCR 方法 (R. M. Horton, et al, Methods Enzymol., 217, 270-279, 1993), 采用 SEQ ID NO: 6 的编码一个 15 氨基酸多肽 (GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer) 的多核苷酸片段来连接 EGF 和 SEA。

第一组引物:

1、含有 SrfI 限制酶切点的 EGF 基因正向引物, 5'-

GAGCCCGGGCAATTCCGATAGCGAGTGT-3' (SEQ ID NO:9);

2、含有一部分接头的 EGF 基因反向引物，5'-GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACC-TCTAAGTTCCCACCATTTCAG-3' (SEQ ID NO:13)，下线表注的是接头的一部分序列。

第二组引物：

1、一部分接头的成熟 SEA 基因正向引物，5'-TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG-AGCGAGAAAAGCGAAGAAATAAATGAA-3' (SEQ ID NO:14)，下线表注的是接头的一部分序列；

2、含有 NotI 限制酶切点的 SEA 基因反向引物，5'-GTGCGGCCGCACTTGTATATAAATATATATCAATATGCAT-3' (SEQ ID NO: 8)。

首先用第一组和第二组的引物分别合成 EGF 基因和 SEA 基因的 DNA 片段，模板是实施 2 和实施 1 的经过 DNA 测序的基因，这是第一步 PCR 反应。然后进行电泳，切割含有 DNA 片段的凝胶，这样就去除了 PCR 反应的引物。

取出以上微量的两种基因片段的 DNA 回收液并将这两者混合，加入 DNA 多聚酶，将两个 DNA 片段连在一起，这个片段就是新一轮 PCR 反应的模板，反应条件是 95℃30 秒→55℃30 秒→72℃150 秒，一共是 3 个循环反应。

再加入第一组引物 (1) 和第二组引物 (2)，最后进行 PCR 反应，PCR 反应的循环条件：95℃30 秒→55℃30 秒→72℃150 秒，一共是 30 个循环反应，最后是 72℃10 分钟。

这样就构建成了 EGF 和 SEA 的融合蛋白质的基因片段。

实施例 5、用含有接头的引物构建 VEGF 和 SEA 的融合蛋白质的基因
与实施例 4 类似，采用重叠延伸 PCR 方法。

第一组引物：

1、含有 SrfI 限制酶切点的正向引物，5'-GAGCCCGGGC GCACCCATGGCAGAAGGAGGA-3' (SEQ ID NO: 11);

2、含有一部分接头的 VEGF 基因反向引物，5'-GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACC-CCGCCTCGGCTTGTACATTTTTC-3' (SEQ ID NO: 15)，下线表注的是接头的一部分序列。

第二组引物：

1、一部分接头的成熟 SEA 基因正向引物，5'-TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG-AGCGAGAAAAGCGAAGAAATAAATGAA-3' (SEQ ID NO:14)，下线表注的是接头的一部分序列；

2、含有 NotI 限制酶切点的 SEA 基因反向引物，5'-

GTGCGGCCGCACTTGTATATAAATATATATCAATATGCAT-3' (SEQ ID NO:8)。

首先用第一组和第二组的引物分别合成 VEGF 基因和 SEA 基因的 DNA 片段，模板是实施例 3 和实施例 1 的经过 DNA 测序的基因，这是第一步 PCR 反应。然后进行电泳，切割含有 DNA 片段的凝胶，这样就去除了 PCR 反应的引物。

取出以上微量的两种基因片段的 DNA 回收液并将这两者混合，加入 DNA 多聚酶，将两个 DNA 片段连在一起，这个片段就是新一轮 PCR 反应的模板，反应条件是 95℃ 30 秒→55℃ 30 秒→72℃ 150 秒，一共是 3 个循环反应。

再加入第一组引物 (1) 和第二组引物 (2)，最后进行 PCR 反应，PCR 反应的循环条件：95℃ 30 秒→55℃ 30 秒→72℃ 150 秒，一共是 30 个循环反应，最后是 72℃ 10 分钟。

这样就构建成了 VEGF 和 SEA 的融合蛋白质的基因片段。

实施例 6、在大肠杆菌中分别表达 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 的融合蛋白质的基因

(A) 构建表达质粒并进行 DNA 序列测定

将实施例 4 和实施例 5 的融合蛋白质基因的 DNA 片段用 SrfI 和 NotI 限制酶处理，同时 pET-34b 质粒也用 SrfI 和 NotI 限制酶处理，再用 DNA 连接酶分别把这两个 DNA 片段连接到 pET-34b 质粒上，DNA 连接酶的反应是 16℃ 12 小时。这样就得到了含有两种融合蛋白质基因的质粒。

用氯化钙制备成感受态大肠杆菌 BL21，通过 Heat shock 方法把这两种质粒分别转入大肠杆菌 BL21，在含有卡那霉素的 LB 培养基中过夜培养，卡那霉素的浓度为 5mg/L。然后筛选有卡那霉素抗性的单菌落。用常规方法 (T. Maniatis, et al, Molecular cloning, A laboratory manual, Second edition, Cold spring harbor laboratory, 1989) 制备和纯化质粒，并鉴定大肠杆菌中的质粒的限制酶图谱，以确定融合蛋白质基因转入大肠杆菌。

这样就分别得到了含有 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白质基因的两种大肠杆菌的菌株，菌株用含有 15% 甘油的培养基保存于 -70℃。

最后将两种质粒中的 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白质基因的 DNA 序列进行测定。

序列表中的 SEQ ID NO:1 是表皮生长因子 (EGF)-接头-超抗原-(SEA) 融合蛋白质基因的序列：从第 1 位氨基酸到第 53 位氨基酸的多肽是 EGF，从第 54 位氨基酸到第 68 位氨基酸的多肽是接头，从第 69 位氨基酸到第 301 位氨基酸的多肽是 SEA。SEQ ID NO:2 是 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。

序列表中的 SEQ ID NO:3 是血管内皮细胞生长因子 (VEGF)-接头-超抗原-

(SEA) 融合蛋白质基因的序列：从第 1 位氨基酸到第 121 位氨基酸的多肽是 VEGF，从第 122 位氨基酸到第 136 位氨基酸的多肽是接头，从第 137 位氨基酸到第 369 位氨基酸的多肽是 SEA。SEQ ID NO:4 是 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。

(B) 融合蛋白质基因的表达

在 37℃ 下分别含有两种质粒的大肠杆菌在含有卡那霉素的培养基中培养，由于这两种融合蛋白质基因是在 T7 启动子的控制下，再在培养液中加入 1mM IPTG，进行过夜培养，它们就可以大量表达。

附图 1 和附图 2 分别表示了构建和表达 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白质基因的实验过程。

实施例 7、分离和纯化 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白质

将实施例 6 中的两种大量表达 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白质的大肠杆菌培养液进行离心 (5000rpm, 30min)，收集菌体并用 50mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗涤，然后用超声波方法破碎大肠杆菌。再进行离心 (10000rpm, 30min)，收集上清液，这样就得到了含有融合蛋白质的粗抽提液。

pET-34b 质粒含有一个 CBD 序列片段，它可以作为分离纯化用的 Tag，利用这个 CBD 的特性，可以使用纤维素树脂来直接分离纯化被表达的外源蛋白质，这个方法具有通用性，用于分离纯化的材料是 CBIND ReadyRun Column (Novagen 公司)。将粗抽提液上样于纤维素树脂的层析柱，当含有 CBD 的融合蛋白质被吸附到纤维素层析柱后，先用 20mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗去杂蛋白质，然后用含有 1% 纤维二糖的磷酸缓冲液洗脱融合蛋白质，收集含有融合蛋白质的洗脱液。

在洗脱液里加入肠激酶以切除 CBD 部分，然后进行透析，透析在 4℃ 低温以及 20mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中进行，这样就去除了纤维二糖。将透析后的溶液再进行纤维素处理，游离的 CBD 部分被吸附到纤维素上，而不含 CBD 的融合蛋白质则不会被吸附，从而就得到了没有 CBD 部分的高纯度融合蛋白质。附图 3 和附图 4 是两种融合蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果，附图 3 表示了精制后的 EGF-SEA，而附图 4 则表示了精制后的 VEGF-SEA。

测定了这两种蛋白质的 N 末端的氨基酸序列，它们分别与 EGF 和 VEGF 的 N 末端氨基酸相同。

实施例 8、EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白的体外抑制肿瘤细胞试验

先将健康人外周血单个核细胞 PBMC 和表达 EGF 受体及 VEGF 受体的人喉癌细胞 Hep2 的浓度调整至大约 2×10^4 – 4×10^4 细胞/ml，将后一种的肿瘤细胞稀释 5 倍并接种于 96 孔培养板，然后再加入没有稀释的 PBMC，这样 PBMC 与肿瘤细胞 Hep2

的效靶比为 5: 1, 这样含有两种细胞的 96 孔培养板制做两份。最后分别加入经过除菌过滤的 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白, 使终浓度分别为 0.00, 0.05, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。将 96 孔培养板放入 CO_2 培养箱, 37°C 培养 48 小时。

另外在含有肿瘤细胞 Hep2 的 96 孔培养板中分别只加入 PBMC、EGF-SEA 或 VEGF-SEA 融合蛋白作为对照实验。

在效靶比 5: 1 的情况下, EGF-SEA 融合蛋白的浓度达到 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时就显示出对于肿瘤细胞的最大抑制率, 图 5 表示了 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白抑制肿瘤细胞的效果, 这个结果说明了 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白可以激活免疫细胞。

而在单独加入 PBMC、EGF-SEA 或 VEGF-SEA 融合蛋白的情况下, 没有观察到肿瘤细胞被明显抑制的现象。

用上述实施例的方法, 发明人制备了各种融合蛋白, 其中配体选自碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 及 FGF 家族、转化生长因子 $\text{TGF-}\alpha$ 、白细胞介素-4、白细胞介素-2、白细胞介素-6、白细胞介素-13、肝素结合 EGF 样生长因子、胰岛素样生长因子、肝细胞生长因子、血小板衍生生长因子、神经生长因子、胎盘生长因子、干细胞因子、白细胞介素-8、Ephrin 家族、Heregulin、erbB 配体、趋化因子、血管生成素、血小板生成素、凝血因子 VII、尿激酶型纤溶酶原激活物、生长激素释放激素、生长抑素、去唾液酸糖蛋白、低密度脂蛋白和转铁蛋白; 超抗原选自 SEB、SEC、SED、SEE, 链球菌毒素的 SPE-A、SPE-B、SPE-C, 病毒蛋白。将这些蛋白用接头连接制备融合蛋白, 表达, 纯化后, 用免疫细胞和癌细胞进行检验, 同样得到了良好的抗癌作用。

权 利 要 求

1、一种融合蛋白，其特征在于，该融合蛋白含有：

- a)促进癌细胞生长并与癌细胞过度表达受体相对应的配体、与癌细胞受体有亲和力及有拮抗作用的人工筛选多肽或直接与癌细胞表面相互作用的多肽分子；
- b)能引起抗癌的免疫反应的超抗原。

2、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，所述的促进癌细胞生长并与癌细胞过度表达受体相对应的配体选自：表皮生长因子 EGF 家族、血管内皮细胞生长因子 VEGF 家族、碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 及 FGF 家族、转化生长因子 TGF- α 、白细胞介素-4、白细胞介素-2、白细胞介素-6、白细胞介素-13、肝素结合 EGF 样生长因子、胰岛素样生长因子、肝细胞生长因子、血小板衍生生长因子、神经生长因子、胎盘生长因子、干细胞因子、白细胞介素-8、Ephrin 家族、Heregulin、erbB 配体、趋化因子、血管生成素、血小板生成素、凝血因子 VII、尿激酶型纤溶酶原激活物、生长激素释放激素、生长抑素、去唾液酸糖蛋白、低密度脂蛋白和转铁蛋白以及其它与癌症或免疫疾病有关联的配体，及其氨基酸序列有 70%以上的相同性的自然变异体和人为的变异体。

3、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，所述的能起抗癌的免疫反应的超抗原选自：金黄色葡萄球菌肠毒素家族的 SEA、SEB、SEC、SED、SEE，链球菌毒素的 SPE-A、SPE-B、SPE-C，病毒蛋白以及其氨基酸序列有 70%以上的相同性的自然和人为的变异体。

4、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，所述的促进癌细胞生长并与癌细胞过度表达受体相对应的配体选自表皮生长因子和血管内皮细胞生长因子。

5、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，所述的能起抗癌的免疫反应的超抗原为金黄色葡萄球菌肠毒素家族的 SEA。

6、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，所述超抗原为 SEA 蛋白；所述配体选自表皮生长因子和血管内皮细胞生长因子。

7、一种重组载体，其特征在于含有编码权利要求 1 所述的融合蛋白的核苷酸序列。

8、一种宿主细胞，其特征在于，该宿主细胞含有权利要求 7 所述的重组载体。

9、一种生产权利要求 1 所述的融合蛋白的方法，其特征在于，培养权利要求 8 所述的宿主细胞，收集表达的权利要求 1 所述的融合蛋白。

10、权利要求 1 所述的融合蛋白的用途，其特征在于，用于制备治疗癌症或免疫疾病的药物。

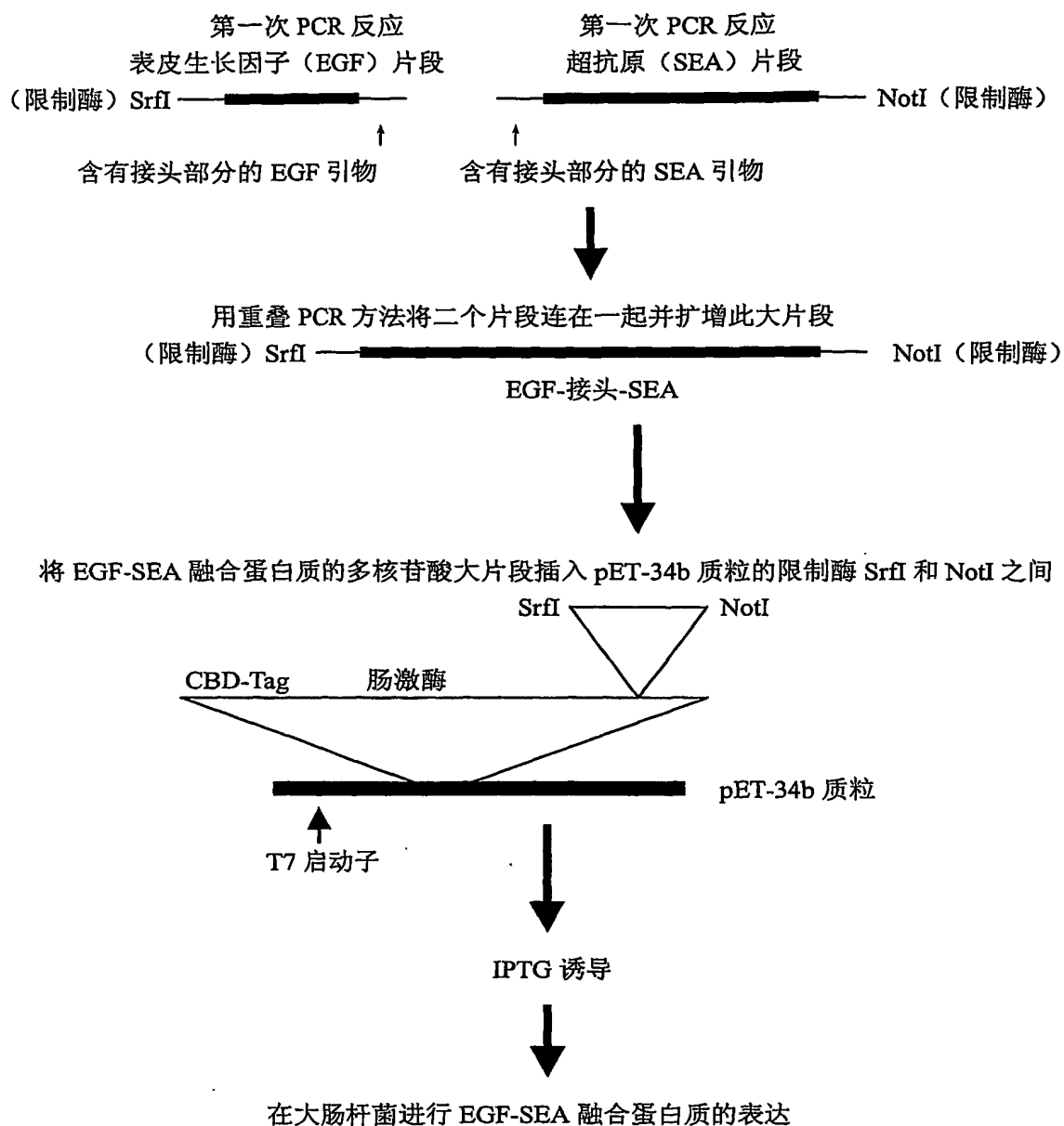


图 1

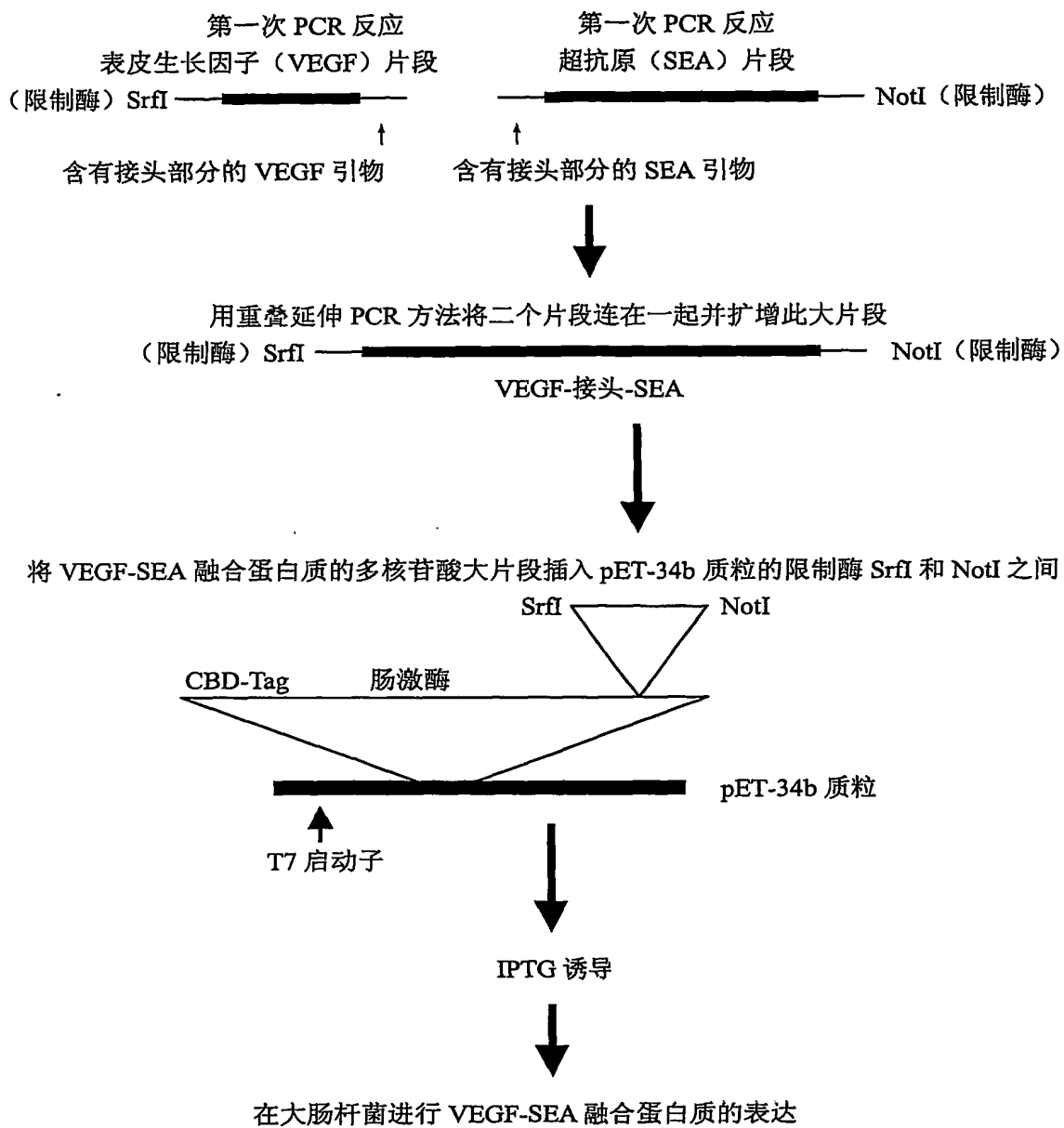


图 2



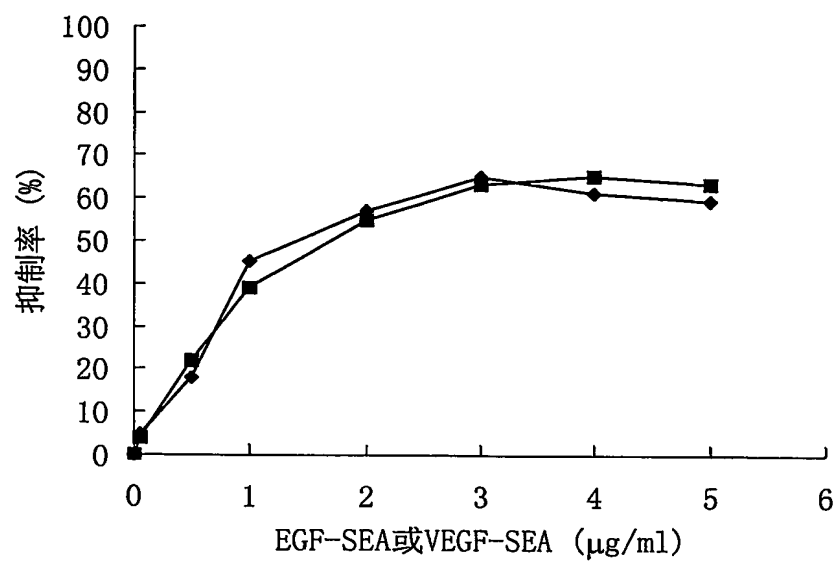
EGF-SEA

图 3



VEGF-SEA

图 4



◆ Hep2 细胞 + EGF-SEA

■ Hep2 细胞 + VEGF-SEA

图 5

序列表

<110> 孙, 嘉琳

<120> 一种可用以抗癌治疗的超抗原融合蛋白质及其生产方法

<130> 042601

<150> CN 200310109829.7

<151> 2003-12-21

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 903

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(903)

<223> 融合蛋白的编码序列

<400> 1

```

aattccgata gcgagtgtcc tctgagtcac gatggttact gtctacatga cggcgtctgt    60
atgtatatatt aggctctaga caagtacgcg tgtaattgctg ttgttggcta catcggtgag    120
cgctgtcagt atcgagatct gaaatgggtg gaacttagag gtggaggcgg ttcaggcgga    180
ggtggctctg gcggtggcgg atcgagcgag aaaagcgaag aaataaatga aaaagatttg    240
cgaaaaaagt ctgaattgca gggaacagct ttaggcaatc ttaaacaat ctattattac    300
aatgaaaaag ctaaaactga aaataaagag agtcacgac aatttttaca gcatactata    360
ttgtttaaag gcttttttac agatcattcg tggataacg atttattagt agattttgat    420
tcaaaggata ttgttgataa atataaaggg aaaaaagtag acttgtagtg tgcttattat    480
ggttatcaat gtgcgggttg tacaccaaac aaaacagctt gtatgtatgg tgggtgaacg    540
ttacatgata ataatcgatt gaccgaagag aaaaaagtgc cgatcaattt atggctagac    600
ggtaaacaaa atacagtacc tttggaacg gttaaaacga ataagaaaaa tgtaactgtt    660
caggagtttg atcttcaagc aagacgttat ttacaggaaa aatataattt atataactct    720
gatgtttttg atgggaaggt tcagagggga ttaatcgtgt ttcatacttc tacagaacct    780
tcggttaatt acgatttatt tgggtgctca ggacagtatt caaatacact attaagaata    840
tatagagata ataaaacgat taactctgaa aacatgcata ttgatataata tttatataca    900
agt                                                    903

```

<210> 2

<211> 301

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(301)

<223> 融合蛋白

<400> 2

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His

1	5	10	15
Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn			
20	25	30	
Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys			
35	40	45	
Trp Trp Glu Leu Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly			
50	55	60	
Gly Gly Gly Ser Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu			
65	70	75	80
Arg Lys Lys Ser Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln			
85	90	95	
Ile Tyr Tyr Tyr Asn Glu Lys Ala Lys Thr Glu Asn Lys Glu Ser His			
100	105	110	
Asp Gln Phe Leu Gln His Thr Ile Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Asp			
115	120	125	
His Ser Trp Tyr Asn Asp Leu Leu Val Asp Phe Asp Ser Lys Asp Ile			
130	135	140	
Val Asp Lys Tyr Lys Gly Lys Lys Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr			
145	150	155	160
Gly Tyr Gln Cys Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr			
165	170	175	
Gly Gly Val Thr Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys			
180	185	190	
Val Pro Ile Asn Leu Trp Leu Asp Gly Lys Gln Asn Thr Val Pro Leu			
195	200	205	
Glu Thr Val Lys Thr Asn Lys Lys Asn Val Thr Val Gln Glu Leu Asp			
210	215	220	
Leu Gln Ala Arg Arg Tyr Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Ser			
225	230	235	240
Asp Val Phe Asp Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Thr			
245	250	255	
Ser Thr Glu Pro Ser Val Asn Tyr Asp Leu Phe Gly Ala Gln Gly Gln			
260	265	270	
Tyr Ser Asn Thr Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn			
275	280	285	
Ser Glu Asn Met His Ile Asp Ile Tyr Leu Tyr Thr Ser			
290	295	300	

<210> 3

<211> 1107

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (1107)

<223> 融合蛋白的编码序列

<400> 3

gcacccatgg cagaaggagg agggcagaat catcacgaag tggatgaagtt catggatgtc	60
tatcagcgca gctactgccca tccaatcgag accctggtgg acatcttcca ggagtaccct	120
gatgagatcg agtacatctt caagccatcc tgtgtgcccc tgatgcgatg cgggggctgc	180
tgcaatgacg agggcctgga gtgtgtgccc actgaggagt ccaacatcac catgcagatt	240
atgcggatca aacctcacca aggccagcac ataggagaga tgagcttcct acagcacaac	300
aaatgtgaat gcagacaaaa gaaagataga gcaagacaag aaaaatgtga caagccgagg	360

```

cggggtggag gcggttcagg cggaggtggc tctggcgggtg gcggatcgag cgagaaaagc 420
gaagaaataa atgaaaaaga ttgcgaaaa aagtctgaat tgcaggaac agcttttaggc 480
aatcttaaac aaatctatta ttacaatgaa aaagctaaaa ctgaaaataa agagagtcac 540
gatcaatttt tacagcatac tatattgttt aaaggctttt ttacagatca ttcgtggtat 600
aacgatttat tagtagattt tgattcaaag gatattgttg ataaatataa agggaaaaaa 660
gtagacttgt atggtgctta ttatggttat caatgtgcgg gtggtacacc aaacaaaaca 720
gcttgtatgt atggtggtgt aacgttacat gataataatc gattgaccga agagaaaaaa 780
gtgccgatca atttatggct agacggtaaa caaaatacag tacctttgga aacggttaa 840
acgaataaga aaaatgtaac tggtcaggag ttgatcttc aagcaagacg ttatttacag 900
gaaaaatata atttatataa ctctgatgtt ttgatggga aggttcagag gggattaatc 960
gtgtttcata ctctacaga accttcggtt aattacgatt tatttgggtc tcaaggacag 1020
tattcaata cactattaag aatatataga gataataaaa cgattaactc tgaaaacatg 1080
catattgata tatatttata tacaagt 1107

```

<210> 4
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(369)
 <223> 融合蛋白

<400> 4

```

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1          5          10          15
Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20        25        30
Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35        40        45
Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50        55        60
Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65        70        75        80
Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85        90        95
Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100       105       110
Gln Glu Lys Cys Asp Lys Pro Arg Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115       120       125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn
130       135       140
Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly
145       150       155       160
Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr Asn Glu Lys Ala Lys Thr Glu Asn
165       170       175
Lys Glu Ser His Asp Gln Phe Leu Gln His Thr Ile Leu Phe Lys Gly
180       185       190
Phe Phe Thr Asp His Ser Trp Tyr Asn Asp Leu Leu Val Asp Phe Asp
195       200       205
Ser Lys Asp Ile Val Asp Lys Tyr Lys Gly Lys Lys Val Asp Leu Tyr
210       215       220
Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr
225       230       235       240

```

Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr
 245 250 255
 Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn Leu Trp Leu Asp Gly Lys Gln Asn
 260 265 270
 Thr Val Pro Leu Glu Thr Val Lys Thr Asn Lys Lys Asn Val Thr Val
 275 280 285
 Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg Arg Tyr Leu Gln Glu Lys Tyr Asn
 290 295 300
 Leu Tyr Asn Ser Asp Val Phe Asp Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile
 305 310 315 320
 Val Phe His Thr Ser Thr Glu Pro Ser Val Asn Tyr Asp Leu Phe Gly
 325 330 335
 Ala Gln Gly Gln Tyr Ser Asn Thr Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn
 340 345 350
 Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn Met His Ile Asp Ile Tyr Leu Tyr Thr
 355 360 365
 Ser

<210> 5
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(45)
 <223> 引物

<400> 5
 ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcgggtggcg gatcg

45

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> 连接肽

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(34)

<223> 引物

<400> 7

gagcccgggc agcgagaaaa gcgaagaaat aaat

34

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> 引物

<400> 8

gtgcggccgc acttgatat aaatatatat caatatgcat

40

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(28)

<223> 引物

<400> 9

gagcccgggc aattccgata gcgagtgt

28

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(28)

<223> 引物

<400> 10

gtgcggccgc tctaagttcc caccattt

28

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(31)

<223> 引物

<400> 11

gagcccgggc gcacccatgg cagaaggagg a

31

<210> 12
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (55)
<223> 引物

<400> 12
gtgcggccgc ccgcctcggc ttgtcacatt tttcttgtct tgctctatct ttctt

55

<210> 13
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (54)
<223> 引物

<400> 13
gccagagcca cctccgcctg aaccgcctcc acctctaagt tcccaccatt tcag

54

<210> 14
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (60)
<223> 引物

<400> 14
tcaggcggag gtggctctgg cgggtggcga tcgagcgaga aaagcgaaga aataaatgaa

60

<210> 15
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (57)
<223> 引物

<400> 15
gccagagcca cctccgcctg aaccgcctcc accccgcctc ggcttgtcac atttttc

57

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/000569

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7:C07K14/00,C07K14/31,C07K19/00,C12N15/62,C12N15/63,A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7:C07K,C12N,A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI ,CPRS,WPLEPODOC,PAJ,CA,BA,GENBANK

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO03003143	1-10
A	PNAS , Vol.99,No.12,June 11,2002,Liesbeth M.Veenendaal et al."In vitro and in vivo studies of a VEGF ₁₂₁ /rGelonin chimeric fusion toxin targeting the neovasculature of solid tumors", page 7866-7871	
A	JOURNAL OF BEIHUA UNIVERSITY(Natural Science)Vol.2,No.3,Jun 2001,Yang Lianjun, et al. "Preparation of the Conjugate of Monoclonal Antibody and Staphylococcal Enterotoxin A and It's Anti-hepatoma Effect", page 209-212	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 2004-09-028	Date of mailing of the international search report 04 · NOV 2004 (04 · 11 · 2004)
Name and mailing address of the ISA/ 6 Xitucheng Rd. Jimen Bridge ,Haidian District Beijing P.R.China 1000088	Authorized officer TANG Hui
Facsimile No. 86-10-62019451	Telephone No. 86-10-62085074



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000569

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☐ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/000569

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CANCER RESEARCH 58 ,August 15,1998,Syed R.Husain et al. "Complete Regression of Established Human Glioblastoma Tumor Xenograft by Interleukin-4 Toxin Therapy", page 3649-3653	1-10
A	FEBS Letters 402,1997,Jean-Michel Dore et al. "Expression and activity of a recombinant Chimeric protein composed of pokeweed antiviral protein and of human Interleukin-2" page 50-52	1-10
A	Biochemical and Biophysical Research Communications 277,2000,Arno Schmidt et al. "Cytotoxic Activity of Recombinant bFGF-rVisumin Fusion Proteins" page 499-506	1-10
A	CANCER REDEARCH 54, October 1,1994, Ako Kihara et al. "Small Chimeric Toxins Containing Only Transforming Growth Factor α and Domain III of Pseudomonas Exotoxin with Good Antitumor Activity in Mice" page 5154-5159	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2004/000569

WO03002143

2003-01-09

US2003039655

2003-02-27

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000569

A. 主题的分类

IPC⁷:C07K14/00,C07K14/31,C07K19/00,C12N15/62,C12N15/63,A61P35/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC⁷:C07K,C12N,A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI,CPRS,WPI,EPODOC,PAJ,GENBANK

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO03002143A	1-10
A	PNAS, Vol.99, no.12, 2002 年 6 月 11 日, Liesbeth M.Veenendaal 等, "In vitro and in vivo studies of a VEGF ₁₂₁ /rGel onin chimeric fusion toxin targeting the nevasculature of solid tumors", 第 7866-7871 页	
A	北华大学学报(自然科学版), Vol.2 No.3, 2001 年 6 月, 杨连君等, "单克隆抗体与葡萄球菌肠毒素 A 结合物的制备及其抗肝癌作用", 第 209-212 页	1-10
A	CANCER RESEARCH 58, 1998 年 8 月 15 日, Syed R.Husain 等, "Complete Regression of Established Human Glioblastoma Tumor Xenograft by Interleukin-4 Toxin Therapy", 第 3649-3653 页	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“I” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2004-09-28

国际检索报告邮寄日期

04 · NOV 2004 (04 · 11 · 2004)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

唐慧

电话号码: (86-10)62085074



国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000569

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列表(接第1页第1(b)项)

1、关于国际申请中所公开的是对要求保护的发明所必要的核苷酸和/或氨基酸序列表, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 材料的类型

☒ 序列表

☐ 与序列表相关的表格

b. 材料的形式

☐ 书面形式

☒ 计算机可读形式

c. 提交/提供时间

☒ 包括于已提交的国际申请。

☐ 以计算机可读形式与国际申请一起提交。

☐ 为检索之用随后提交本国际检索单位。

2、☐ 另外, 在提交/提供了多个序列表和/或与其相关的表格的版本或副本的情况下, 提

供了关于后提交的或附加的副本与已提交之国际申请中的序列表相同或未超出国际申请中序列表范围(如适用)的声明。

3. 补充意见

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	FEBS Letters 402,1997 年, Jean-Michel Dore 等, “Expression and activity of a recombinant chimeric protein composed of pokeweed antiviral protein and of human Interleukin-2”, 第 50-52 页	1-10
A	Biochemical and Biophysical Research Communications 277, 2000 年, Arno Schmidt 等, “Cytotoxic Activity of Recombinant bFGF-rViscumin Fusion Proteins”, 499-506 页	1-10
A	CANCER RESEARCH, 54, 1994 年 10 月 1 日, Ako,Kihara 等, “Small Chimeric Toxins Only Transformin Growth Factor α and Domain III of Pseudomonas Exotoxin with Good Antitumor Activity In Mice”, 5154-5159	1-10

国际申请号
PCT/CN2004/000569

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO03002143	2003-01-09	US2003039655	2003-02-27

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.